

ДЕЯКІ МЕХАНІЗМУ ЗАХИСТУ ВІД СВИНЦЕВОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Андрейко Г. П., Баранов Р. О.

Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)

Проведено експериментальне дослідження балансу біоелементів тканин печінки за умов моделювання свинцевої інтоксикації у щурів. Визначено роль металотіонеїнів у підтримці клітинного гомеостазу есенціальних металів і транспортно-детоксикаційної функції печінки в умовах різного часового періоду адаптації піддослідних тварин до навантаження малими дозами Плюмбум ацетату..

Ключові слова: важкі метали, Плюмбум, металотіонеїни, мікроелементи, обмін хімічних елементів, інтоксикація, механізми захисту організму, біохімічна адаптація, перерозподіл мікроелементів, цинк, купрум.

НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТЫ ОТ СВИНЦОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Андрейко Г. П., Баранов Р. А.

Проведено експериментальное исследование баланса биоэлементов тканей печени в условиях моделирования свинцовой интоксикации у крыс. Определена роль металлотионеинов в поддержке клеточного гомеостаза эссенциальных металлов и транспортно-детоксикационной функции печени в условиях различного временного периода адаптации подопытных животных к нагрузке малыми дозами ацетата свинца.

Ключевые слова: тяжелые металлы, свинец, металлотионеины, микроэлементы, обмен химических элементов, интоксикация, механизмы защиты организма, биохимическая адаптация, перераспределение микроэлементов, цинк, медь.

SOME MECHANISM OF PROTECTION FROM LEAD INTOXICATION

Andreiko H. P., Baranov R. A.

Keywords: Heavy metals, Lead, metallothionein, minerals, exchange of chemical elements, the intoxication, the body's defence mechanisms, biochemical adaptation, redistribution of trace elements, Zinc, Copper.

Вступ

Значне антропогенне навантаження навколишнього середовища, в тому числі важкими металами (ВМ), викликає мобілізацію власних захисних механізмів організму, направлених, в першу чергу, на підтримання гомеостазу. Більша частка важких металів, як і інших хімічних забруднювачів, потрапляє у довкілля внаслідок інтенсивного розвитку промисловості та транспорту, нераціонального використання природних ресурсів і урбанізації життя суспільства. ВМ призводять до активації систем захисту організму, спрямованих на підтримання гомеостазу. Двовалентні метали (Кадмій, Цинк, Плюмбум, Купрум та ін.) зв'язуються з сульфгідрильними групами специфічних і неспецифічних транспортних білків. (Iwata et al., 2003). Перевищення фонових концентрацій металів у навколишньому середовищі викликає порушення обмінних процесів (Ершов и др., 1993).

В забезпеченні адекватного мінерального обміну та детоксикації токсичних металів важливе значення відіграють металотранспортні білки, серед яких металотіонеїнам (МТН) за правом належить одна з пріоритетних ролей, особливо в забезпеченні біодоступності Цинку, детоксикації і виведенні з організму ряду важких металів. Синтез МТН та стресових протеїнів забезпечує виживання біологічної системи та її адаптацію до змінених умов навколишнього середовища (Astrid and etc., 2009, Цудзевич, 2011). Він посилюється при пошкодженні клітин надмірною активацією процесів вільнорадикального окислення, що супроводжуються підвищеним рівнем утворення активних форм кисню (Margoshes and etc., 1957). Здатність МТН до швидкого зв'язування двовалентних іонів ВМ забезпечується наявністю тіольних груп залишків цистеїну, які становлять до 30 % від усього амінокислотного складу молекули білка. Міцність сполук Цинку, Купруму, Кадмію, Плюмбуму з цими низькомолекулярними білками значно перевищує таку для зв'язування їх з іншими високомолекулярними (альбумін) і

низькомолекулярними (наприклад, глутатіон) сполуками (Шафран и др., 2011, . Sutherland D.E., Stillman M.J., 2011).

Передумовою для нашого дослідження слугували дані літератури (Пыхтеева, 2009, Данилин, 2010, Шафран и др., 2011) про важливу роль МТН в протіканні основних біохімічних реакцій, пов'язаних з обміном і реалізацією токсичної дії важких металів в нормі і при патології. Концентрація МТН в рослинних і тваринних клітинах є інформативним показником розвитку окисного стресу при дії γ -випромінювання та ВМ. На сьогодні підвищення рівня МТН розглядається як одна з форм адаптивної відповіді організму (Котеров, Филиппович, 1995; Котеров и др., 1998). На думку А. В. Жолніна (2001) і О. Г. Пихтеєвої (2013), проблеми дисбалансу хімічних елементів та механізми участі білків в процесах обміну важких металів в мікроелементології досліджені недостатньо. Це пов'язано, як із спеціальними вимогами до апаратури та кваліфікації фахівців-дослідників, так і з недостатньо розробленою теоретичною базою, що описує шляхи обміну та процеси біотрансформації металів (Пыхтеева, 2013). Тому на сьогодні дана тема є досить актуальним напрямком наукових досліджень.

Метою нашої роботи було вивчення мікроелементного складу печінки та вмісту металотіонеїнів (МТН) в плазмі крові і тканинах печінки в умовах різного часового періоду адаптації експериментальних тварин до свинцевої інтоксикації. Робота була виконана в рамках НДР міжфакультетської валеологічної лабораторії ХНУ імені В.Н.Каразіна.

Об'єкти та методи дослідження

В роботі використовували щурів-самців лінії Wistar, віком 3 місяці, масою 180–210 г, які знаходились на стандартному раціоні віварію Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. За даними ветеринарного обстеження тварини були здорові. Усі процедури проводились з дотриманням біоетичних принципів роботи стосовно

лабораторних тварин згідно з Хельсінкською декларацією про гуманне ставлення до тварин.

Експериментальні дослідження проводились у зимово–весняний період (лютий–квітень) в один і той самий час – о 9–10 годині ранку. Відібраних щурів розподілили на групи (по 10 особин в кожній): перша – інтактна (контрольна); експериментальним групам тварин через день 5-кратно внутрішньом'язово вводили розчин солі плюмбуму ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) з еквівалентною кількістю іону плюмбуму 62,5 мг/кг маси тіла. На 10-ту (однодобовий період адаптації) і 25-ту добу (15-добовий період адаптації) тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під легким ефірним наркозом.

Визначення концентрації металотіонеїнів у плазмі крові та гомогенаті печінки проводили безпосередньо після декапітації за методикою, розробленою Шафран і Пихтєєвою (Шафран и др., 2011). Визначення концентрації кадмію в підготованих пробах плазми крові та печінки, а також вміст мікроелементів у печінці після попередньої пробопідготовки (Патент України, 2012) проводили методом атомно-абсорбційної спектроскопії на спектрометрі С-115М1 («Selmi», Суми) (Прайс, 1976). Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою програми SPSS 15.0 «for Windows» та Microsoft Office Excel 2007. Статистика порівнювання проводилась за t-критерієм Стюдента і U критерієм Манна–Уїтні.

Результати та їх обговорення

Пошкоджуюча дія іонів Pb (II) може проявлятися на різних структурних рівнях: молекулярному, клітинному, на рівні органів і всього організму. ВМ отруюють живий організм і чисто механічно засмічують його, осідаючи на стінках найтонших систем ниркових та печінкових каналів, знижуючи, таким чином, їх фільтраційну здатність. Проте

найбільш важливі аномальні ефекти, в тому числі інгібування ферментативної ланки та механізмів антиоксидантного захисту, незворотні конформаційні зміни макромолекул, і, як наслідок, зміни швидкості метаболізму і синтезу, виникнення мутацій спостерігаються на молекулярному рівні (Жолнин, 2001). Відповідно, це призводить до накопичення токсинів і продуктів життєдіяльності клітин, тобто самоотруєння організму, оскільки печінка відповідає за біотрансформацію та детоксикацію токсичних речовин і продуктів життєдіяльності організму, а нирки – за їх виведення назовні (Калетина и др., 2007). Принцип роботи системи виведення однаковий: транспортні клітини утворюють шар, один бік якого межує з внутрішнім середовищем організму, інший – з зовнішнім. Мембрана клітин не пропускає ксенобіотики, в ній є білок-переносник, який розпізнає токсичні речовини і переводить їх у зовнішнє середовище (Жолнин, 2000).

Основну роль у механізмах переносу металів, безперечно, відіграють білки. Металотранспортні білки відносяться до класу металопротеїнів і в організмі відповідають, головним чином, за зв'язування та транспорт ендогенних й екзогенних металів (Пыхтеева, 2012). За літературними даними іони Pb^{2+} , здатні міцно зв'язуватися з сульфгідрильними групами різних білків і небілкових сполук, зокрема компонентів антиоксидантного захисту (Трахтенберг та ін., 1994). Отримані нами концентрації металотіонеїнів (табл. 1) у плазмі щурів з однодобовим періодом адаптації статистично достовірно ($p \leq 0,01$) перевищують на 179,3 %, а у щурів з 15-ти добовим періодом адаптації – на 174,3 % концентрацію МТН у плазмі щурів інтактної групи.

Таблиця 1.

Інтегральний вміст МТН у крові та печінці експериментальних тварин з різним періодом адаптації (n=10)

Група	Інтактна	PbAc (1- добова адаптація)	PbAc (15- добова адаптація)
Концентрація МТН в плазмі крові, нмоль/л	3,62 ± 0,38	6,49 ± 0,24**	6,31 ± 0,68*
Концентрація МТН в печінці, нмоль/г	3,41 ± 0,12	5,71 ± 0,40*	4,05 ± 0,23* ⁺

*Примітки: * – статистично значимі розбіжності t-критерію Стьюдента на рівні $p \leq 0,05$ у порівнянні з інтактною групою;*

*** – статистично значимі розбіжності t-критерію Стьюдента на рівні $p \leq 0,01$ у порівнянні з інтактною групою*

+ – статистично значимі розбіжності t-критерію Стьюдента на рівні $p \leq 0,01$ у порівнянні з інтактною групою

МТН приймають активну участь в механізмах протидії виникненню оксидативного стресу (Шафран и др., 2011). Зв'язування металотіонеїнів з ВМ у міцні комплекси відбувається в основному в печінці, де спостерігаються процеси біодеградації введеного металу. Аналізуючи отримані результати можна відзначити, що вміст металотіонеїнів у печінці щурів інтактної групи близький до відомих нам літературних даних. Так у інтактній групі, за даними Л.М. Шафрана і співавторів (2011), середня концентрація МТН в печінці складає 3,29 нмоль/г, отримані нами величини знаходяться в межах статистичної похибки. Показники вмісту МТН у печінці достовірно підвищенні у групі щурів з одностодовим періодом адаптації на 167,5 %, а у групі щурів з 15-ти добовим періодом адаптації – на 18,79 % у порівнянні з інтактною групою.

Таким чином у групі піддослідних тварин на 15-ту добу адаптації зберігається підвищення вмісту МТН в плазмі крові, але спостерігається статистично значиме зниження концентрації МТН на 141 % у печінці. Можна зробити припущення, що у тканинах печінки протягом двох тижнів після останнього введення PbAc відбувається перерозподіл і

біотрансформація більшої частки введеного токсиканту, по-друге – до процесів біохімічної адаптації включаються інші механізми захисту організму. Для підтвердження даної гіпотези, ми визначили концентрацію мікроелементів у тканинах печінки (табл. 2).

Таблиця 2

Концентрація мікроелементів в тканинах печінки, мкг/г живої ваги

Мікроелемент	Інтактна група	PbAc (1-добова адаптація)	PbAc (15-добова адаптація)
Плюмбум (Pb)	1,73 ± 0,13	20,47 ± 6,44**	6,44 ± 0,67** ⁺
Кадмій (Cd)	0,47 ± 0,11	0,33 ± 0,17	0,76 ± 0,081** ⁺
Купрум (Cu)	0,89 ± 0,051	3,77 ± 0,23**	0,45 ± 0,053** ⁺
Цинк (Zn)	17,30 ± 0,77	120,4 ± 6,49**	22,6 ± 1,12** ⁺
Манган (Mn)	1,24 ± 0,13	1,34 ± 0,091	1,01 ± 0,11 ⁺
Кобальт (Co)	1,71 ± 0,16	2,13 ± 0,11*	0,77 ± 0,060** ⁺
Нікол (Ni)	1,34 ± 0,11	2,05 ± 0,11*	0,70 ± 0,055** ⁺

*Примітки: * – статистично значимі розбіжності t-критерію Стьюдента на рівні $p \leq 0,05$ у порівнянні з інтактною групою;*

*** – статистично значимі розбіжності t-критерію Стьюдента на рівні $p \leq 0,01$ у порівнянні з інтактною групою*

+ – статистично значимі розбіжності t-критерію Стьюдента на рівні $p \leq 0,01$ у порівнянні з інтактною групою

Розглядаючи вміст Плюмбуму у печінці піддослідних тварин, можна відзначити достовірне падіння його концентрації у щурів з 15-ти добовим періодом адаптації в 3,18 раз у порівнянні з групою щурів з одностовим періодом адаптації. Проте за 15 діб відновлення концентрація Pb (II) не повертається до рівня інтактної групи щурів, перевищуючи її в 3,72 рази. Водночас протягом 15-ти діб в цій експериментальній групі спостерігається статистично значиме ($p \leq 0,05$) накопичення вмісту Кадмію.

Підвищення пулу Купруму і Цинку (4,24 та 6,96 раз відповідно) у порівнянні з показниками інтактної групи в групі щурів з однодобовим періодом адаптації, узгоджується з отриманим нами високим вмістом МТН в печінці. Вірогідно індукція синтезу МТН, викликана введенням токсиканта, є одним з первинних механізмів захисту організму від надходження малих доз Рb (II). На 15-ту добу адаптації спостерігається зниження концентрації вказаних вище металів у 8,38 раз (Cu) та 5,35 раз (Zn) у порівнянні з групою щурів з однодобовим адаптаційним періодом, що також узгоджується з падінням рівня МТН в ній.

Зазначимо, що концентрації досліджених нами перехідних металів Мангану, Кобальту і Ніколу в групі щурів з однодобовим періодом адаптації підвищуються, а з 15-ти добовим – знижуються (статистично значимо при $p \leq 0,05$, за винятком Mn). Дані метали стимулюють на різних етапах процеси кровотворення, посилюють обмінні процеси, тому порушення їх балансу, як і решти досліджуваних елементів негативно впливає на функціональний стан організму.

Мікроелементи відіграють істотну роль в молекулярних механізмах адаптації (Авцын и др., 1991), а МТН безпосередньо приймають участь в регуляції гомеостазу Цинку і Купруму, а також токсичних металів (Cd, Pb). Синтез МТН в печінці залежить, в тому числі, від рівня Цинку, Купруму і Селену, тому інтегральний показник вмісту МТН може характеризувати поточний стан надходження, розподілу та елімінування цих металів.

Оскільки гомеостаз біометалів виступає як окрема форма загальної гомеостатичної системи організму, то його порушення відображаються на здатності організму до адаптації в екстремальних умовах, так як супроводжуються значною перебудовою обмінних процесів.

Висновки: МТН відіграють важливу роль в механізмах захисту організму від свинцевої інтоксикації. Підвищення концентрації МТН при навантаженні малими дозами плюмбум ацетату може виступати як один із

адаптаційних механізмів захисту організму при інтоксикації даним металом, оскільки припускається, що синтез МТН є генетично детермінованим механізмом захисту організму від оксидативного стресу (И. Данилин, 2010).

Встановлено, що концентрація металотіонеїнів в досліджуваних зразках плазми крові щурів обох експериментальних груп залишається достовірно високою протягом всього періоду дослідження. Зниження рівня МТН у тканинах печінки на 15-ту добу адаптації, вірогідно, пов'язано з перерозподілом в ній мікроелементного складу та статистично значимим падінням концентрацій Pb, Cu та Zn.

Список літератури

1. Iwata K., Saito H., Moriyama M. Renal tubular function after reduction of environment cadmium exposure: A ten years follow-up // Arch. Environ. Health. – 2003. – Vol.48/3. – P. 157–163.
2. Ершов Ю.А. Общая химия. Биофизическая химия. Химия биогенных элементов. / Ершов Ю.А., Попков В.А., Берлянд А.С. и др.– Высшая школа, 1993. -560 с.Astrid S., Helmut S., Roland K. O./ Metallothioneins and Related Chelators (Metal Ions in Life Sciences). — Copyright: 2009. - 514 p.
3. Astrid S., Helmut S., Roland K. O./ Metallothioneins and Related Chelators (Metal Ions in Life Sciences). — Copyright: 2009. - 514 p.
4. К.О. Цудзевич Металозв'язувальна здатність металотіонеїнів печінки щурів за отруєння важкими металами / К.О. Цудзевич, І.В. Калінін // Український біохімічний журнал – 2011 – Т. 83, №4 – С. 108-112.
5. Margoshes, M. and B.L. Vallee (1957). «A cadmium protein from equine kidney cortex». Journal of American Chemical Society 79 (17): 4813.
6. Шафран Л.М., Пыхтеева Е.Г., Большой Д.В. Металлотионеины / Под редакцией проф. Л.М. Шафрана - Одесса: Издательство "Чорномор'я", 2011. - 428 с.

7. Sutherland DE, Stillman MJ. «The "magic numbers" of metallothionein». // Metallomics (May 2011)3 (5): 444–63.
8. Пыхтеева Е.Г. Металлотионеин: биологические функции. Роль металлотионеина в транспорте металлов в организме // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2009. № 4 (18)
9. Данилин, И. А. Металлотионеины как биомаркеры при действии на организмы тяжелых металлов и ионизирующего излучения // автореферат д. б.н. / электронный ресурс // режим доступа <http://www.dissercat.com>
10. Котеров, А.Н. Радиобиология металлотионеинов / А.Н. Котеров, И.В. Филиппович // Радиационная биология. Радиоэкология. 1995. - Т.35. - Вып. 2. - С.162-180.
11. Котеров, А.Н. Влияние цинк-металлотионеина на перекисное окисление липидов в клетках костного мозга грызунов / А.Н. Котеров, З.А. Требенюк, Н.Б. Пушкарева, А.В. Никольский // Радиационная биология. Радиоэкология. -1998а. Т.38. - Вып.3. - С.426-430.
12. Пыхтеева Е.Г. Исследование роли металлотионеинов в защите организма человека от воздействия тяжелых металлов при недостаточности адаптационных механизмов. // Journal of Health Sciences – 2013; 3(5): P. 59–72
13. Національний Патент України № u 201203421 Гончаренко М.С., Коновалова О.О., Андрейко Г.П., Гладка О.О., Спосіб визначення вмісту важких металів в біологічному матеріалі// Патент UA№ 73527 U 2012. Бюл. № 18.
14. Прайс В. Аналитическая атомно-абсорбционная спектроскопия. Пер. с англ. – М.: Мир, 1976. – 360 с. // Prajs V. Analiticheskaya atomno-absorbtsionnaya spektroskopiya. Per. s angl. – М.: Mir, 1976. – 360 s.
15. Калетина Н., Калетин Г. Многоликие металлы. // Наука в России. – 2007. – № 1.
16. Жолнин А.В. Комплексные соединения. Челябинск: ЧГМА, 2000. –28 с.

17. Е.Г.Пыхтеева. Изучение индукции металлотионеинов в печени мышей при внутрибрюшинном введении двухвалентных металлов // Современные проблемы токсикологии. – 2012. - № 1 (56) С.24
18. Трахтенберг И. М., Колесников В. С., Луковенко В. П. Тяжелые металлы во внешней среде: современные гигиенические и токсикологические аспекты. – Минск: Наука и техника, 1994. – 258 с.
19. Авцын А.П. Микроэлементы человека/Авицын А.П., Жаворонков А.А, Риш М.А., Строчкова Л.С. – М.: Медицина, 1991 г. – 477 с.